

**Ю.Л. Себякин,
профессор,
У.А. Буданова
аспирант**

*кафедра Химии и технологии
биологически активных соединений
им. Н.А. Преображенского
МИТХТ им. М.В. Ломоносова*

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ СТРУКТУРА – СВОЙСТВА В РЯДУ КАТИОННЫХ ЛИПОПЕПТИДОВ

УДК 547.466+547.395

Осуществлён синтез липопептидов, содержащих ArgGlu, OrnGlu, OrnGln, LysGlu, LysGln. Амфифильные свойства обеспечивались за счёт образования ди- и моноэфиров глутаминовой кислоты и глутамина с различными по длине алифатическими спиртами. Для полученных соединений определены параметры ККМ и выявлена взаимосвязь между структурой и свойствами.

Доставка нуклеиновых кислот, белков и некоторых лекарственных веществ в клетку, необходимая для проявления терапевтического эффекта, затруднена неспособностью этих веществ самостоятельно преодолевать плазматическую мембрану. Поэтому необходимо создание транспортных систем, которые могут проникать сквозь мембрану за счёт процессов слияния или эндоцитоза. Известно, что агрегаты, образованные в водной среде катионными алифатическими производными аминокислот и пептидов, способны эффективно проникать в клетку [1] и являются нетоксичными и биodeградируемыми [2]. Кроме того, разнообразие реакционноспособных функциональных группировок природных аминокислот предоставляет возможность создания на их основе различных по строению амфифилов, подходящих для конкретной области применения [3].

Ранее нами был осуществлён синтез серии катионных бис-амфифилов на основе L-глутаминовой кислоты. Исследованы мембранообразующие свойства нового типа катионных димеров. Показано, что все бис-амфифилы образуют липосомы, устойчивые к

действию дестабилизирующих факторов (этанол, детергенты) [4]. Для соединений определены значения критических концентраций мицеллообразования (ККМ) и температуры фазовых переходов. Выявлено, что димерные структуры обладают более низкой ККМ, по сравнению с их мономерными аналогами. Установлено, что формируемые катионные липосомы образуют с ДНК различные по морфологии комплексы, способные эффективно проникать в клетку и обеспечивать экспрессию репортерных генов [5].

В данной работе, нами синтезирован ряд липидоподобных алифатических производных дипептидов, изучены их мембранообразующие свойства и выявлены взаимосвязи между структурой и свойствами.

Синтез соединений (XVI-XVII) осуществлялся по следующей схеме 1.

Реакцию между N-гидроксисукцинимидными эфирами соответствующих аминокислот и эфирами глутаминовой кислоты проводили по методу активированных эфиров [6] при небольшом избытке последних (соотношение реагентов 1:1.2 соответственно) в тетрагидрофуране в присутствии водного раствора KHCO_3 , необходимого для создания слабой щелочной среды. За ходом реакции наблюдали по данным ТСХ. Продукты реакции выделяли с помощью препаративной хроматографии на пластинках с силикагелем и колоночной хроматографии. Структуры полученных соединений подтверждались данными ИК- и ^1H -ЯМР-спектроскопии.

Таблица 1. Значения критических концентраций везикуло- и мицеллообразования для соединений (XVI-XXII).

Формула	ККВ (ККМ), моль/л
(XVI) ArgGlu(C16) ₂	$9 \cdot 10^{-4}$
(XVII) OrnGlu(C16) ₂	$2,0 \cdot 10^{-4}$
(XVIII) LysGlu(C16) ₂	$7,5 \cdot 10^{-4}$
(XIX) OrnGlu(C8) ₂	$9 \cdot 10^{-4}$ ($1,0 \cdot 10^{-4}$)
(XX) OrnGlnC16	$(4,0 \cdot 10^{-5})$
(XXI) LysGlnC16	$(6,5 \cdot 10^{-5})$
(XXII) OrnGlu(5-OH)C16	$3 \cdot 10^{-4}$ ($8,5 \cdot 10^{-5}$)

Удаление *трет*-бутилоксикарбонильной защиты осуществляли действием безводной трифторуксусной кислоты. В ¹H-ЯМР-спектре наблюдалось исчезновение сигналов протонов, соответствовавших защитным группам при сохранении содержательной части спектров оставшейся структуры. В зарегистрированном масс-спектре присутствовали пики молекулярных ионов соединений (XVI-XVII). Данные элементного анализа удовлетворительно соответствовали расчётным величинам. Короткоцепной катионный амфифил (XIX) и катионные амфифилы, содержащие в гидрофобном участке одну углеводородную цепь (XX-XXII) получали по аналогичной схеме.

Для образования α -гескадецилового эфира *L*-глутамина и α -гескадецил-*γ*-*трет*-бутил-*L*-глутамата реакция этерификации проводилась в течение 4 ч в

условиях азеотропной отгонки воды с толуолом. Этот метод характеризуется мягкими условиями и позволяет работать с термолабильными соединениями.

Изучены некоторые мембранообразующие свойства полученных амфифилов.

Критические концентрации везикулообразования

Был приготовлен ряд образцов с концентрациями амфифилов в воде от 10^{-2} до 10^{-5} моль/л и для каждого определена оптическая плотность. Полученные значения ККВ (ККМ) приведены в таблице 1.

Показано, что кривая зависимости оптической плотности от логарифма концентрации для соединений (XVI-XVIII, XX, XXI) имеет типичный вид с одной точкой перегиба, что характерно для поверхностно-активных соединений (рис. 1).

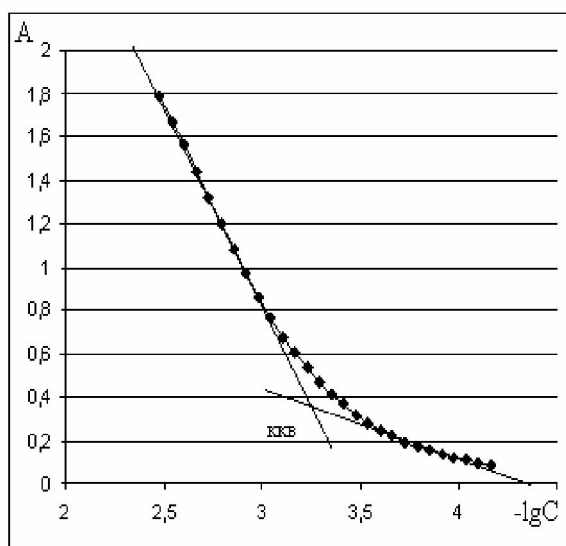


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от длины волны для соединения (XVIII).

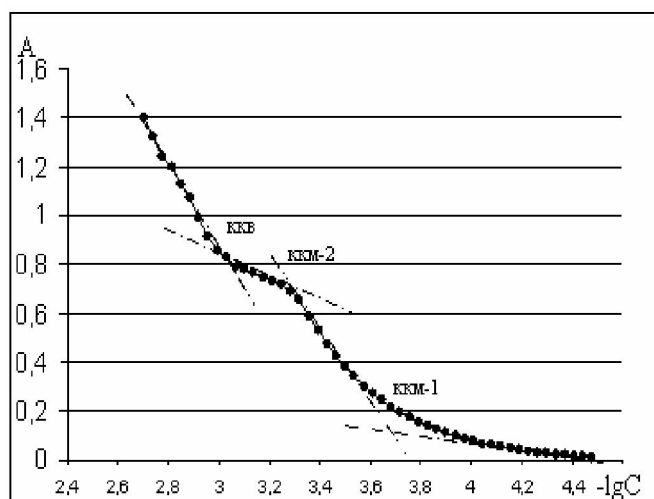


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от длины волны для соединения (XIX)

В отличие от соединений на основе дигексадецилового эфира, для соединения на основе диоктилового эфира наблюдается нетипичное для амфифилов поведение в водной среде. Кривая зависимости оптической плотности от длины волны для соединения (XIX) имеет три точки перегиба (рис. 2).

По литературным данным, это может быть связано с различными структурными переходами [7]:

- от дисперсии к мицеллам (ККМ-1),
- от обычных шарообразных мицелл к дисковым мицеллам, которые являются предшественниками бислойных агрегатов (ККМ-2),
- образование липосом (ККВ).

Графически такие переходы возможно изобразить следующим образом (рис. 3):

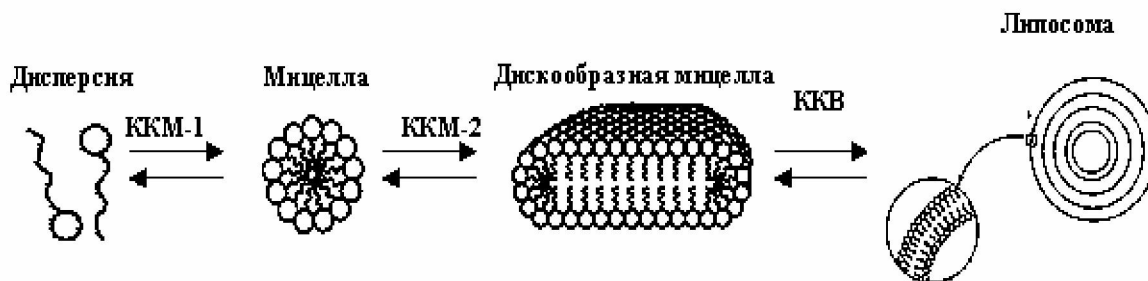


Рис. 3. Предполагаемые структурные переходы для соединения (XIX) [7].

Интересные результаты были получены для амфифила (XXII). Структура этого соединения способствует образованию, как внутренней соли, так и возникновению межмолекулярных ионных взаимодействий в водной среде. В литературе агрегаты, которые при этом могут образовываться, принято называть «луковичные чешуйки» – onions – (рис. 4) [8].

При этом переход от первичных мицелл к вторичным также характеризуется

дополнительным перегибом на графике зависимости оптической плотности от концентрации (рис. 5).

Для катионных амфифилов это впервые наблюдаемое явление.

Таким образом, показана возможность целенаправленного изменения морфологии агрегатов липопептидов на основе диоктилового и моногексадецилового эфиров *L*-глутаминовой кислоты в зависимости от концентрации в воде.

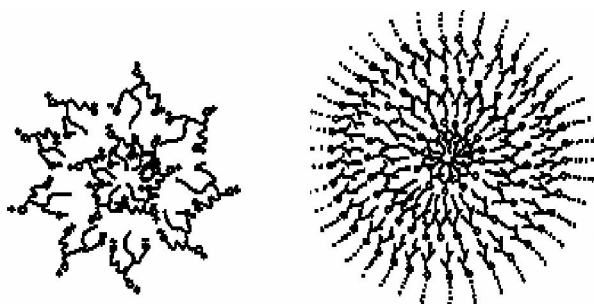


Рис. 4. Многослойные мицеллярные агрегаты.

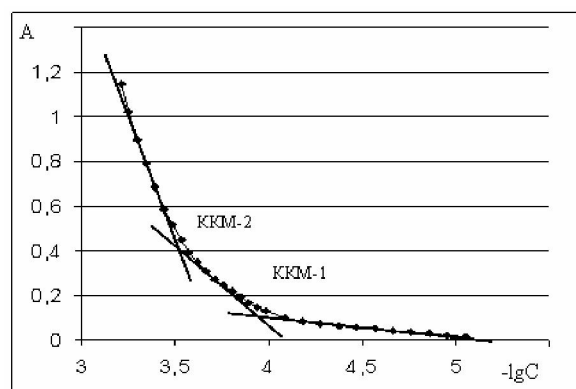


Рис. 5. Зависимость оптической плотности от концентрации для соединения (XXII).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 5-*трет*-бутиловый эфир *L*-глутаминовой кислоты (Fluka, Швейцария) Вос-замещённые *N*-гидроксисукцинимидные эфиры *L*-аргинина, *L*-орнитина и *L*-лизина получены, согласно [10]; дигексадециловый и диоктиловый эфиры *L*-глутаминовой кислоты получены, согласно [11].

Спектры ^1H -ЯМР регистрировали в дейтерохлороформе и $\text{DMCO-}d_6$ на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker WM – 400 (Германия) с рабочей частотой 400 МГц. Внутренний стандарт – гексаметилдисилоксан. ИК спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu IR – 435 (Япония). Измерение оптической плотности проводились на спектрофотометре Jas.co-7800 (Япония). Масс-спектры получены на времяпролетном масс-спектрометре VISION 2000 (Великобритания) методом MALDI с использованием в качестве матрицы дигидроксibenзола (DHG).

Тонкослойная хроматография проводилась на пластинках Silufol (Чехословакия) в системах: хлороформ – метанол, 9 : 1; хлороформ – метанол – 30% аммиак, 5 : 3 : 1; толуол – хлороформ – метилэтилкетон – изопропанол, 10 : 6 : 3 : 1; хлороформ – метанол – уксусная кислота, 5 : 4 : 1; гексан – ацетон, 7 : 1. Вещества, содержащие амидные связи, обнаруживали обработкой парами хлора с последующим опрыскиванием 1%-ным раствором KI в воде. Препаративную тонкослойную хроматографию проводили на силикагеле L 5/40 мкм (Чехословакия), колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле 45/80 мкм (Merck, Германия). Температуры плавления определяли на приборе Boetus (Германия) и не корректировали.

Для всех конечных соединений в масс-спектре зарегистрированы пики молекулярных ионов. Данные элементного анализа удовлетворительно соответствовали расчётным величинам.

Трис-*трет*-бутилоксикарбониларгинилглутаминовой кислоты дигексадециловый эфир (XV). К раствору Вос-Arg(Вос₂)-OSu 98 мг (0.17 ммоль) в 4мл ТГФ, добавляли 0.2 мл 10%-ного водного раствора гидрокарбоната калия и при перемешивании на магнитной мешалке порциями добавляли 110 мг (0.18 ммоль) Glu(C₁₆)₂ (XII). Смесь выдерживалась при комнатной температуре 5 ч. По окончании реакции растворитель удаляли в вакууме. Целевой продукт выделяли при помощи препаративной тонкослойной хроматографии в системе (В). Получали 52 мг (30 %) аморфного продукта Вос₃ArgGlu(C₁₆)₂, R_f (В) 0.71, $[\alpha]_D^{20} +19^\circ$ (с 0.1, C₂H₅OH). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl₃, δ , м. д.): 0.83 (т, 6H, 2CH₃); 1.0 (с, 2H, CH₂); 1.27 (с, 52H, CH₂); 1.45 (с, 9H, C(CH₃)₃); 1.5 (с, 18H, 2C(CH₃)₃); 1.6 (м, 4H, 2 β CH₂); 1.8-2.1 (м, 4H, 2 α CH₂); 2.28 (м, 2H, CH₂); 2.5 (т, 2H, CH₂COO); 3.8-4.2 (м, 2H, 2CH); 4.35 (т, 2H, CH₂); 5.6 (д, 1H, CONH). ИК-спектр (вазелиновое масло, ν_{max} , см⁻¹): 3500 (NH); 2910 (CH), 2902 (CH); 1740 (C=O); 1700 (C=O); 1630 (C=O, I амидная полоса); 1560 (NH, II амидная полоса); 1450 (CH); 1400 (CH); 1364 (CH); 1210; 1100 (C-O).

Аналогично получали **(Бис-*трет*-бутилоксикарбонил-орнитил)-глутаминовой кислоты дигексадециловый эфир (XIII)**

Аналогично получали **(бис-*трет*-бутилоксикарбонил-*L*-лизил)- глутаминовой кислоты дигексадециловый эфир (XIV).**

Аргинилглутаминовой кислоты дигексадециловый эфир бистрифторацетат (XVI). Растворяли 25 мг (0.023 ммоль) Вос₃ArgGlu(C₁₆)₂ в 0.3 мл безводной трифторуксусной кислоты. Раствор выдерживали при комнатной температуре 6 ч. Кислоту отгоняли в вакууме до постоянного веса. Получали 20 мг (77 %) ArgGlu(C₁₆)₂ в

виде аморфного вещества, R_f (Г) 0.18, $[\alpha]_D^{20} + 14^\circ$ (c 0.1, C_2H_5OH). 1H -ЯМР-спектр ($CDCl_3$, δ , м. д.): 0.8 (т, 6H, $2CH_3$); 1.0 (с, 2H, CH_2); 1.6 (м, 4H, $2\beta CH_2$); 1.7-2.1 (м, 4H, $2\alpha CH_2$); 2.3 (м, 2H, CH_2); 4.0 (м, 2H, $2CH$); 4.35 (т, 2H, CH_2). ИК-спектр (в пленке, ν_{max} , cm^{-1}): 3500 (NH), 2909 (CH), 2900 (CH), 1740 (C=O), 1670 (C=O, I амидная полоса), 1664 (NH, II амидная полоса), 1470 (CH), 1450 (CHNC), 1252 (CF), 790, 700, 650. Найдено, %: C 55.91; H 9.30; N 7.24. $C_{44}H_{87}F_6N_5O_9$. Вычислено, %: C 55.97; H 9.29; N 7.42.

Аналогично получали **орнитилглутаминовой кислоты дигексадециловый эфир бистрифторацетат (XVII)**.

Аналогично получали **лизилглутаминовой кислоты дигексадециловый эфир бистрифторацетат (XVIII)**.

Орнитилглутаминовой кислоты диоктиловый эфир бистрифторацетат (XIX), орнитилглутамина гексадециловый эфир бистрифторацетат (XX), лизилглутамина гексадециловый эфир бистрифторацетат (XXI), орнитилглутаминовой кислоты 5-гексадециловый эфир трифторацетат (XXII) получали по аналогичной схеме.

Получение липосом

Раствор 10 мг липидов в 2 мл хлороформа медленно упаривали на ротаторном испарителе в круглодонной колбе. Остаток высушивали в вакууме 50 мин при $20^\circ C$. Затем прибавляли 2 мл дистиллированной воды и при нагревании до $70^\circ C$ встряхивали в течение 15 мин. Образовавшуюся дисперсию использовали в качестве мультиламеллярных липосом.

Определение критической концентрации везикулообразования

Оптическую плотность липидных дисперсий регистрировали в интервале концентраций $10^{-3} \div 10^{-6}$ М при длине волны 450 нм и температуре $18-20^\circ C$. Критическую концентрацию мицеллообразования определяли по точке перегиба зависимости $A_{450}/-lgC$.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 05-04-48544).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Narang A. S., Thoma L., Miller D. D., and Mahato R. I. Bioconjugate Chem. 2005, 16, 156.
2. Zelphati O., Wang V., Kitada S., Reed J.C., Felgner P.L., and Corbei J. J. Biol. Chem. 2001, 271, 37, 35103.
3. Valivety R., Jauregi P., Gill I. and Vulfson E. JAOCS, 1997, 74, 7, 879.
4. Жданов Р.И., Эль-Кадри А., Московцев А.А., Себякин Ю.Л., Ларин А.С., Муранов А.В., Хохлов А.Р. Доклады АН. 2004, 398, 118.
5. Полякова А.А., Панченкова И.А., Скрипникова М.А., Себякин Ю.Л. Биол. мемб. 2003, 20, 178.
6. Гринштейн Д., Виноц М., Химия аминокислот и пептидов Мир, 1965
7. Овчинников Ю.А., Биоорганическая химия. М.: «Просвещение», 1987, 556.
8. Jayakumar R., Murugesan M. Rafiuddin Ahmed M. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2000, 10, 1547.
9. Позднеев В. Ф. Биоорганическая химия. - 1986, 12, 1013.
10. Себякин Ю. Л., Федякова Н. Л., Рунова Е. А. Биоорганическая Химия. 1994, 20, 1101.